

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10447

研究課題名(和文) アディポカインであるアクチビンの歯周病における病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of activin as an adipokine on periodontal disease

研究代表者

林田 秀明 (HAYASHIDA, Hideaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：20238140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アクチビンは脂肪組織から分泌されるアディポカインであるが、歯周病の発症及び進行に関与しているかについては明らかにされていない。本研究の目的は歯周病におけるアクチビンの病態生理学的役割を調べることである。本研究の結果において、リコンビナントのアクチビンは歯周組織を構成する細胞の遺伝子およびタンパク質の変化を起こさなかった。また、歯周組織を構成する細胞からアクチビンと特異的に反応する分子は同定されなかった。口腔上皮細胞においてアクチビン受容体は歯周原細菌により発現の上昇が示唆された。歯周病に対するアクチビン及びその受容体の役割を明らかにするためには更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は肥満で悪化しやすいことが明らかになってきており、生活習慣だけでなく、様々な生体物質が関係することも明らかになってきている。アディポカインは脂肪組織から分泌される生体物質であるが、アクチビン受容体が口腔上皮細胞で歯周病細菌の刺激での上昇が観察されたことは、歯周病において一定の役割を果たしている可能性が示唆された。今後の研究の進展によってアクチビン受容体を標的とした歯周病の診断や予防につながる可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Activin as an adipokine secreted from adipose tissues has not been clear to be associated with the onset and progression of periodontitis. The purpose of the study is to examine the pathophysiological role of activin on periodontal diseases. The results in this study showed recombinant activin do not significantly have change proteins in periodontal cells. It was suggested that an activin receptor was up-regulated by a periodontal pathogen. Further study will be needed to clarify a role of activin on periodontal diseases.

研究分野：口腔保健学

キーワード：アクチビン 歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周ポケットのバイオフィルムが主因となっておこる慢性疾患であるが、糖尿病や肥満などの全身的因子によって修飾されることにより、歯周病の発症、進行、治療後の予後に変化があることが明らかになっている。我々の研究グループは世界に先駆けて「肥満と歯周病」が関連していることを報告した(Saito T, et al. Obesity and periodontitis, *New Engl J Med*, 1998)。その後、内臓脂肪と歯周病の関連(Saito T, et al. Relationship between upper body obesity and periodontitis, *J Dent Res*, 2001)や、さらに肥満が糖尿病の状態(耐糖能)にかかわらず歯周病と関連していること(Saito T, et al. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study, *J Periodont Res*, 2005)メタボリックシンドロームの項目数と歯周病が強く関連していることなどを報告してきた(Shimazaki Y, Saito T, et al. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study, *J Dent Res*, 2007)。これらを踏まえ内臓脂肪から分泌され全身の健康に深くかかわるさまざまなアディポカインの研究に着手し、善玉アディポカインであるアディポネクチンが破骨細胞の活性化を抑制する働きがあることを報告した(Yamaguchi N, et al. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007. Yamaguchi N, et al. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling, *FEBS Letters*, 2005)。また、血清中のアディポカインと歯周病に関する研究において、血清中のレジスチンレベルが、歯周病を有する者では有意に高いことがわかった(Saito T, et al. Resistin and Adiponectin in Women with Periodontitis: Hisayama Study, *J Dent Res*, 2008; Furugen R, et al. The relationship between periodontal condition and serum levels of resistin and adiponectin in Japanese elderly people, *J Periodont Res*, 2008)。プログランユリン、ビスファチンおよびレプチンといったアディポカインも歯周病と関連することが他の研究グループにより報告されており、これらの歯周組織における生体反応に関して総説として報告した(Hayashida H, et al. Periodontal Host Response in Subjects with Obesity, *Curr Oral Health Reports*, 2018)。しかしながら、歯周病との関連が不明なアディポカインがまだまだ多く残されている。最近、アクチビン A、AB、B といったアクチビンのアイソフォームが脂肪細胞から分泌されるアディポカインとして報告されているが、歯周病との関連については明らかではない。

2. 研究の目的

歯周病の病態形成には、歯周病原細菌の感染、微小循環障害、過剰な免疫応答および炎症性組織破壊が関与することが知られており、様々なアディポカインの関与がこれまでに報告されているが、新たなアディポカインの一つとして注目されているアクチビンがどのような影響を与えるかについては明らかにされていない。本研究の目的は、歯周病の発症・進行に関連して、口腔上皮細胞、歯肉線維芽細胞、破骨前駆細胞および破骨細胞などの歯周組織を構成する細胞において、アクチビンおよびその受容体である ActR1、ActR2 が関与することによって誘導される特異的な遺伝子やタンパク質の検索、口腔上皮細胞と線維芽細胞の細胞接着性への影響について解明すること、また、アクチビンが歯周病原細菌の病原性に及ぼす影響、すなわち、抗菌的作用、増殖への直接的な作用、また歯周病原細菌のタンパク質の産生に影響があるかについて検討することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来口腔上皮細胞、線維芽細胞、破骨前駆細胞および破骨細胞のアクチビン受容体の発現解析

口腔上皮細胞、線維芽細胞、破骨前駆細胞および破骨細胞を培養後、細胞を破碎し RNA を抽出後、逆転写酵素で相補 DNA を合成し、アクチビン受容体 ActR1、ActR2 遺伝子に特異的なプライマーを用いて、定量的 PCR を行い、ActR1 および ActR2 遺伝子発現と細胞間の発現量の差について解析した。

歯周病関連細菌 *ポルフィロモナス・ジンジバリス* 由来リポ多糖(以下 PgLPS と略す)、Pg 菌懸濁液にて刺激した歯周組織関連細胞におけるアクチビン受容体 ActR1、ActR2 の発現と細胞間の発現量についても同様に解析した。アクチビン受容体の蛋白質レベルの発現について、培養細胞を破碎し、破碎物を可溶化しポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下 SDS-PAGE と略す)を行い、ナイロン膜に転写後、これらに対する特異抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

上記の培養細胞の一部を分離固定し、アクチビン受容体の特異抗体を用いた免疫組織化学染色を行い光学顕微鏡で観察した。

(2) 口腔上皮細胞および線維芽細胞のタンパク質発現に対するアクチビン A の影響

口腔上皮細胞および線維芽細胞をリコンビナントのアクチビン A 添加の培地で培養後、細胞を破碎し、SDS-PAGE を行い、染色し、アクチビン A を添加していない対照と電気泳動のパターンを比較して、タンパク質の発現の差異について解析した。

- (3) 口腔上皮細胞および線維芽細胞の細胞接着に対するアクチビン A の影響
基質がコートされた細胞接着プレートにアクチビン A を加えて細胞を培養し、非付着の細胞を洗浄除去し、プレートに付着した細胞を染色後吸光度測定し、細胞接着能を評価した。
- (4) Pg による歯肉上皮細胞および線維芽細胞の炎症性サイトカインの発現およびアクチビンのサブユニットタンパク質のインヒビン A および B の遺伝子発現
Pg 刺激によって歯肉上皮細胞および線維芽細胞において炎症性サイトカインの遺伝子発現およびアクチビンのサブユニットタンパク質のインヒビンベータサブユニット A および B の遺伝子発現インヒビン B の遺伝子発現について解析した。対照群はリン酸緩衝生理食塩水で処理を行った。
- (5) アクチビン A の歯周病原細菌の増殖・タンパク質発現に対する影響の検討
Pg を寒天培地に播種し、異なる濃度のアクチビン A を含浸させた滅菌ディスクを寒天培地上に置いて培養し、滅菌ディスク周囲に発育阻止円の評価を行った。
異なる濃度のレジスチンが添加された液体培地に Pg を接種し、経時的に吸光度を測定し、増殖に差がみられるか解析した。またアクチビン A の濃度の違いによってタンパク質の発現に変化がみられるかについて 2 次元電気泳動で解析した。

4. 研究成果

- (1) 口腔上皮細胞、線維芽細胞、破骨前駆細胞および破骨細胞のアクチビン受容体の発現解析
すべての細胞において ActR1、ActR2 遺伝子に相当する増幅産物が得られたことから、すべての細胞でこの 2 つの遺伝子が発現していることが示された。
ActR1、ActR2 に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット法において、すべての細胞で蛋白質レベルでの発現が確認された。培養細胞のタンパク質を分画してウエスタンブロット法を行ったところ、細胞膜画分に ActR1、ActR2 受容体が存在することが確認された。PgLPS では ActR1、ActR2 遺伝子およびタンパク質の発現に差異は認められなかったが、Pg 菌では発現量が増加していた。これらの結果から、LPS ではない Pg 菌の菌体成分が ActR1、ActR2 の発現の上昇に関与している可能性があることを示唆している。
ActR1 に対する免疫組織化学染色では、PgLPS で刺激された口腔上皮細胞表面が濃染されており、Pg 菌の感染によって発現が誘導されることが示唆された。
- (2) 口腔上皮細胞および線維芽細胞のタンパク質発現に対するアクチビン A の影響
口腔上皮細胞および線維芽細胞の細胞破碎物の SDS-PAGE パターンには対照と比較してアクチビン A の添加で顕著な差は認められなかった。
- (3) 口腔上皮細胞および線維芽細胞の細胞接着に対するアクチビン A の影響
口腔上皮細胞および線維芽細胞を細胞接着プレートに濃度の異なるアクチビン A を加えて細胞を培養し、コートされたプレートに付着した細胞を染色し定量し、細胞接着への影響を評価した。対照と比較してアクチビン A によって細胞接着性に顕著な変化は認められなかった。
- (4) Pg による歯肉上皮細胞および線維芽細胞の炎症性サイトカインの発現およびアクチビン A のサブユニットタンパク質のインヒビン A および B の遺伝子発現
Pg 処理群では代表的な炎症性サイトカインであるインターロイキン 1、インターロイキン 6、ケモカイン C-C モチーフリガンド 2 の遺伝子発現が対照群と比較して有意に上昇していた。アクチビン A を構成するサブユニットであるインヒビンベータサブユニット A および B の遺伝子発現を評価したところ、Pg 処理群においていずれも上昇していた。これらの結果は、炎症性サイトカインと並行してアクチビン A が上昇することを示唆しているが、インヒビンベータサブユニットは他のアクチビンおよびインヒビンのサブユニットタンパク質でもあるので詳細な解析が今後必要である。
- (5) アクチビン A の Pg の増殖・タンパク質発現に対する影響の検討
Pg の増殖に対するアクチビン A の影響を検討するために、ペーパーディスクに濃度の異なるアクチビン A を添加して阻止円の形成の観察を行ったところ、血中濃度を超えても阻止円の形成は認められなかったため、抗菌的な働きは確認されなかった。
アクチビン A を添加した液体培地と添加していない液体培地で Pg の増殖を経時的に吸光度を測定したところ顕著な変化は認められなかったことから、アクチビン A の Pg の増殖における影響は低いことが示唆された。また、アクチビン A を添加した液体培地と添加していな

い液体培地から Pg を回収し細胞破碎後、全タンパク質を二次元電気泳動し、発現パターンの違いについて比較したところ顕著な変化は認められなかったことから、Pg が産生するタンパク質の発現に対して直接的な影響は低いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ai Sekiguchi, Shin-Ya Kawashiri, Hideaki Hayashida, Yuki Nagaura, Kenichi Nobusue, Fumiaki Nonaka, Hiroto Yamanashi, Masayasu Kitamura, Koji Kawasaki, Hideki Fukuda, Takahiro Iwasaki, Toshiyuki Saito, Takahiro Maeda	4. 巻 10;25(1):82
2. 論文標題 Association between high psychological distress and poor oral health-related quality of life (OHQoL) in Japanese community-dwelling people: the Nagasaki Islands Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environ Health Prev Med	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12199-020-00919-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furugen Reiko, Kawasaki Koji, Kitamura Masayasu, Maeda Takahiro, Saito Toshiyuki, Hayashida Hideaki	4. 巻 62
2. 論文標題 Association of low fetuin-A levels with periodontitis in community-dwelling adults	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 67~69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.18-0282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田英輝、北村雅保、川崎浩二、林田秀明、古堅麗子、岩崎理浩、田代謙輔、前田隆浩、五月女さき子、川下由美子、齋藤俊行
2. 発表標題 地域住民における歯間ブラシの使用状況と歯周疾患との関連：五島研究
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代謙輔、五月女さき子、船原まどか、川下由美子、北村雅保、福田英輝、古堅麗子、岩崎理浩、林田秀明、川崎浩二、東 美穂、前田隆浩、齋藤俊行
2. 発表標題 地域住民を対象とした舌圧と口腔および全身健康状態との関連性：五島研究
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 俊行 (SAITO Toshiyuki) (10170515)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究分担者	古堅 麗子 (FURUGEN Reiko) (90253674)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	永田 康浩 (NAGATA Yasuhiro) (80336164)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------